

**ÜBER DIE BEZIEHUNGEN DER
NIEDERMOLEKULAREN SERUMINHIBITOREN
UND DES INTER- α -TRYPSININHIBITORS ZU DEN
NIEDERMOLEKULAREN PROTEASENINHIBITOREN
AUS DEM SEKRET DES
OBEREN RESPIRATIONSTRAKTES**

Norbert Udo Tisowsky

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0041

Aus dem biochemischen Laboratorium (Leitung: Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H.H.
Naumann) und dem Zentralkrankenhaus Gauting (Direktor: Prof. Dr. H. Blaha)

ÜBER DIE BEZIEHUNGEN DER NIEDERMOLEKULAREN SERUM-
INHIBITOREN UND DES INTER- α -TRYPSININHIBITORS ZU DEN
NIEDERMOLEKULAREN PROTEASENINHIBITOREN AUS DEM SEKRET
DES OBEREN RESPIRATIONSTRAKTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Norbert Udo Tisowsky
aus
München

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München



Berichterstatler: Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser

Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.1975

Gliederung

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. THEORETISCHER TEIL	2
1. Definition der Proteaseninhibitoren	2
2. Reaktionsmechanismus der Hemmung	3
3. Bedeutung des inhibierenden Systems im Respirationstrakt	3
4. Die Proteaseninhibitoren im oberen Respirationstrakt und im Serum des Menschen	5
4.1. Die Inhibitoren des Respirationstraktes	5
4.1.1. Das α_1 -Antitrypsin	6
4.1.2. Die niedermolekularen Sekretinhibitoren	6
4.2. Die Proteaseninhibitoren im Blutserum	10
4.2.1. Das Inter- α -antitrypsin	11
4.2.2. Die niedermolekularen Serum-inhibitoren	11
5. Die Beziehungen der Inhibitoren zueinander	13
III. ERGEBNISSE	16
IV. MATERIAL UND METHODEN	21
1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	21
2. Vorbereitung des Bronchialsekreteluats und des Serums zur Bestimmung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren	21
3. Bestimmung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren aus dem Bronchialsekret und dem Serum	22

	Seite
4. Bestimmung des Proteingehalts im Bronchialsekreteluat	24
5. Quantitative Bestimmung des Inter- α -antitrypsins im Serum	25
V. DISKUSSION	28
VI. ZUSAMMENFASSUNG	30
Literaturverzeichnis	31

I. EINLEITUNG

Über den Respirationstrakt steht der Organismus am unmittelbarsten mit der Umgebung in Kontakt. Auf diesem Weg gelangen auch pathogen wirkende Substanzen leicht in den Körper. Der Respirationstrakt ist daher gegenüber Infektionen ein besonders gefährdeter Bereich. Zum Schutz gegen pathogene Agentien sind in den Luftwegen verschiedene Abwehrsysteme vorhanden. Die größeren Teilchen - etwa ab 2μ - werden durch das Flimmerepithel wieder nach außen befördert. Ist das nicht ausreichend, wird ein Husten- bzw. Nießreflex ausgelöst, bei dem die Luft, und damit die eingedrungenen Substanzen, explosionsartig ausgeworfen werden. Antigene, gegen die der Organismus bereits Antikörper produziert hat, werden durch die Antigen-Antikörperreaktion inaktiviert. Daneben werden aber auch pathogene Substanzen, insbesondere in den nicht mit Flimmerepithel ausgekleideten Bereichen, von den aus dem Blut eingewanderten Leukozyten phagozytiert und, soweit als möglich, verdaut. Nach Beendigung dieser Funktion zerfallen die Leukozyten und setzen ihre lysosomalen, unter anderem auch proteolytisch wirkenden, Enzyme frei. Diese Proteasen können auch das körpereigene Eiweiß hydrolysieren.

Um die sogenannte Selbstverdauung, die wiederum als pathologischer Prozeß zu bezeichnen ist, zu verhindern, stehen den Proteasen natürliche Antagonisten, die Proteaseinhibitoren, gegenüber. Inhibitoren kommen nicht nur im Sekret des Respirationstraktes vor, sondern auch in anderen Organen des Körpers. Im Blutserum existieren ebenfalls große Mengen verschiedener Proteaseinhibitoren. Der sogenannte Inter- α -trypsininhibitor und ein niedermolekularer Inhibitor aus dem Serum zeigen eine immunologische Verwandtschaft zu den Inhibitoren des oberen Respirationstraktes. In der vorliegenden Arbeit soll durch den Vergleich der jeweiligen Konzentrationen untersucht werden, ob außer der immunologischen Verwandtschaft noch weitere Beziehungen der Inhibitoren zu einander bestehen.

II. THEORETISCHER TEIL

1. Definition der Proteaseninhibitoren

Proteasen sind Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. In der systematischen Nomenklatur werden sie unter die C-N-Hydrolasen eingereiht. Man unterscheidet sie nach der Art des Angriffsortes an den Proteinen. Die Endopeptidasen oder auch Proteinasen, spalten bestimmte Bindungen innerhalb der Proteinkette. Die Exopeptidasen oder Peptidasen, spalten Aminosäuren von den Enden einer Peptidkette ab. Dabei differenziert man noch zwischen den Carboxypeptidasen, die am Carboxylende angreifen und den Amino-peptidasen, die am Aminoende wirksam sind. (1)

Wo in einem Organismus Proteasen vorkommen, sind meistens ihre natürlichen Antagonisten, die Proteaseninhibitoren, vorhanden. Es sind entweder hochmolekulare Proteine oder auch relativ niedermolekulare Polypeptide. Sie besitzen die Fähigkeit, die verschiedenen proteolytisch wirkenden Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin und Proteasen aus Leukozyten, Bakterien und Pilzen in ihrer Aktivität zu blockieren. Man konnte sie in vielen pflanzlichen und tierischen Geweben, sowie in Drüsensekreten und im Blutserum nachweisen, isolieren und charakterisieren.

Die Proteaseninhibitoren lassen sich nach zwei verschiedenen Kriterien unterteilen: Man hat festgestellt, daß sich in den reaktiven Zentren, von denen die Hemmwirkung gegen Trypsin ausgeht, entweder ein Lysin- oder ein Argininrest befindet, weshalb man von Lysin- bzw. Arginininhibitoren spricht. Durch Acylierung der ϵ -Aminogruppen werden die Lysininhibitoren inaktiviert, während die Arginininhibitoren ihre volle Aktivität behalten. Die zweite Einteilungsmöglichkeit wird nach der Art der Hemmspektren vorgenommen. Verschiedene

Inhibitoren können nur bestimmte Proteasen hemmen, andere hingegen haben ein sehr breites Hemmspektrum.

2. Reaktionsmechanismus der Hemmung

Die enzymatische Proteolyse ist eine Reaktionsfolge: Zunächst geht das proteolytische Enzym mit dem zu spaltenden Protein eine Komplexverbindung ein. Im Komplex wird das Substrat hydrolysiert, wobei Proteinbruchstücke entstehen, und die Protease wieder freigesetzt wird. Bei der Hemmung bildet die Protease, wie bei der Proteolyse, mit dem Inhibitor eine Komplexverbindung. Die anschließende Hydrolyse des Moleküls mit Freisetzung der aktiven Protease erfolgt jedoch nicht. Die Protease bleibt somit an den Inhibitor gebunden und für die Spaltung weiterer Proteine blockiert. Bei dieser Reaktion kann es zur Hydrolyse der im aktiven Zentrum lokalisierten Peptidbindung kommen, ohne daß es zum Verlust der Hemmwirkung kommt. Man spricht hierbei auch von einer limitierten Proteolyse des Inhibitors. (2)

3. Bedeutung des inhibierenden Systems im Respirationstrakt

Lungenemphyseme und Bronchiektasien sind irreversible Erweiterungen der Alveolen tragenden Lufträume bzw. einer oder mehrerer Bronchien. Die sackartigen Ausbuchtungen beruhen auf einer Schädigung der elastischen Fasern, des Knorpelgewebes und der Muskulatur. Als ätiologische Faktoren der Bronchiektasien gelten pulmonale Entzündungen in der frühen Jugend, die häufig im Anschluß an Keuchhusten und Masern auftreten. Außerdem entstehen sie noch nach Primärerkrankungen wie chronischer Bronchitis, Emphysemen, Atelektasien, Pleuraschwarten, Tuberkulose, Lungenfibrosen etc. Beim Erwachsenen führt die chronische Bronchitis und Bronchiolitis meist zu Lungenemphysemen,

im Kindesalter zu Bronchiektasien. Die ätiologischen Faktoren des Lungenemphysems sind die bereits genannten chronische Bronchitis und Bronchiolitis. Bei hereditärem α_1 -Antitrypsinmangel tritt fast immer ein Lungenemphysem auf, das auch mit Bronchiektasien vergesellschaftet sein kann. (3)

Gemeinsames Auftreten von Lungenemphysemen und erblichen α_1 -Antitrypsinmangel wurde erstmals von LAURELL und ERIKSSON (1969) beschrieben. (4, 5) Bei Reduktion des α_1 -Antitrypsingehalts auf 10 % des Normalwertes entwickelt sich mit hoher statistischer Signifikanz bereits im 4. Lebensjahrzehnt ein chronisch obstruktives Lungenemphysem. Eine Erklärung für diesen Zusammenhang wurde aus der biochemischen Wirkung des α_1 -Antitrypsins abgeleitet. Dieser Proteaseninhibitor hemmt neben Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein auch leukozytäre Proteasen. Die lysosomalen Leukozytenproteasen haben die Aufgabe, das phagozytierte Material abzubauen. Beim Zerfall der Leukozyten werden sie in die Umgebung freigesetzt, ohne dabei ihre proteolytische Aktivität zu verlieren. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine gesteigerte Proteolyse als Ursache der Atemwegsobstruktionen angesehen. (6, 7, 8)

Während pathologischer Vorgänge mit eitrigen Infektionen oder bei Abszedierungen kommt es in der Tat zur massiven Emigration mit anschließendem Zerfall von Leukozyten, und so zu einer starken Proteasenfreesetzung. Die physiologischerweise vorhandene α_1 -Antitrypsinmenge in den Lungenalveolen und im Bronchialbaum - zusammen mit dem niedermolekularen Proteaseninhibitor - ist meistens ausreichend, um alle freien Leukozyten- und Makrophagenproteasen zu inaktivieren. Übersteigt jedoch die Proteasenfreesetzung die Inhibitorkapazität, so kommt es zur Einschmelzung körpereigenen Gewebes. (5) Experimentell wurde gezeigt, daß das Lungenparenchym von Leukozytenproteasen angegriffen werden kann. (9) Durch Applikation verschiedener Proteasen über die Atemluft konnten Lungenemphyseme künstlich erzeugt werden. In Tier-

versuchen führte freie proteolytische Aktivität bereits nach kurzer Zeit zu den ersten destruktiven Veränderungen. Wurden diese Bedingungen über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten, entwickelte sich ein obstruktives Emphysem. (10 - 14) Bei Personen, die proteasenhaltigem Staub ausgesetzt sind, wie beispielsweise Arbeiter der Detergentienindustrie - Waschmitteln, werden häufig proteolytische Enzyme zugesetzt - konnte ebenfalls eine Emphyseminduktion beobachtet werden. (15, 16) Wie Versuche gezeigt haben, läßt sich die Emphysementwicklung durch Zuführung von α_1 -Antitrypsin in die Luftwege stoppen. In den Fällen, in denen wegen eines Gendefekts der α_1 -Antitrypsinspiegel im Serum stark erniedrigt ist - Normalwert ca. 200 mg% - zeigt sich allgemein eine besondere Anfälligkeit gegen broncho-pulmonale Affektionen. (17, 18, 19)

Im gesamten broncho-pulmonalen Bereich wird der Inhibitorschutz hauptsächlich von drei verschiedenen Hemmstoffen gewährleistet: Im distalen Abschnitt, der nicht mit Flimmerepithel ausgekleidet ist, übernimmt das α_1 -Antitrypsin fast ausschließlich die Schutzfunktion, während im oberen Anteil nur etwa 15 - 20 % auf das α_1 -Antitrypsin entfallen, und 80 - 85 % von zwei niedermolekularen säurestabilen Proteaseninhibitoren gestellt werden. (20)

4. Die Proteaseninhibitoren im oberen Respirationstrakt und im Serum des Menschen

4.1. Die Inhibitoren des Respirationstraktes

In den Sekreten des oberen Respirationstraktes lassen sich drei verschiedene Proteaseninhibitoren nachweisen: Das α_1 -Antitrypsin und zwei niedermolekulare, säurestabile Inhibitoren mit Molekulargewichten von 14 000 und 20 000. (20, 21, 22, 23)

4.1.1. Das α_1 -Antitrypsin

Das α_1 -Antitrypsin, das im Serum den Hauptteil der α_1 -Globulinfraktion stellt, wird durch Transsudation in das Lumen der Luftwege abgegeben. Es handelt sich dabei um ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 12 % und einem Molekulargewicht von ca. 45 000. 90 % der im Blutserum feststellbaren antitryptischen Aktivität entfallen auf diesen Inhibitor. Im reaktiven Zentrum ist ein Lysinrest lokalisiert, d. h. das α_1 -Antitrypsin ist ein Lysininhibitor, der durch Acylierung der ϵ -Aminogruppen inaktiviert werden kann. Der polyvalente Inhibitor vermag neben den Pankreasproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein auch leukozytäre und acrosomale Proteasen sowie Bakterien- und Pilzproteasen zu hemmen. (2)

Im Sekret des oberen Respirationstraktes liegt im physiologischen Zustand der Anteil der antiproteolytischen Aktivität, der auf das α_1 -Antitrypsin zurückzuführen ist, bei etwa 15 - 20 %. Dieser Prozentsatz kann jedoch bei pathologischen Zuständen durch erhöhte Transsudation bis auf ca. 60 % ansteigen. Die physiologische Bedeutung des α_1 -Antitrypsins kann aus der Hemmwirkung gegen freigesetzte leukozytäre Proteasen abgeleitet werden. Bei Personen, die einen erblich bedingten Mangel an α_1 -Antitrypsin aufweisen, bilden sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Lungenemphyseme aus, jedoch nicht so häufig Bronchiektasien. Unter der Voraussetzung, daß gesteigerter Proteasenanfall auch zu Obstruktionen der oberen Luftwege führt, war aus diesen Beobachtungen zu schließen, daß neben dem α_1 -Antitrypsin weitere, davon unabhängig gebildete Inhibitoren, vorhanden sein müssen. (4, 20)

4.1.2. Die niedermolekularen Sekretinhibitoren

Bei der Fraktionierung von Bronchial- oder Nasensekret an Sephadex G-75 wurden eine höhermolekulare und eine niedermolekulare Fraktion mit antipro-

teolytischer Aktivität gefunden. (21) Der höhermolekulare Anteil wurde als α_1 -Antitrypsin identifiziert, während der niedermolekulare Teil durch zwei verschiedene säurestabile Inhibitoren repräsentiert wird. (24) Die beiden niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren mit den Molekulargewichten von etwa 14 000 und 20 000 sind im Mengenverhältnis 85 : 15 % vorhanden. Außer durch ihr Molekulargewicht unterscheiden sie sich noch in der Aminosäurezusammensetzung. (Tabelle 1) Obwohl es sich um Arginininhibitoren handelt, besitzen sie ein sehr ähnliches Hemmspektrum wie das α_1 -Antitrypsin: Sie hemmen die proteolytischen Pankreasenzyme Trypsin, Chymotrypsin, Pronase (aus *Streptomyces griseus*) und Leukozytäre Proteasen. Bei der Immunelektrophorese bilden diese beiden Inhibitoren nur mit dem spezifischen Antiserum gegen das Inter- α -antitrypsin ein Präzipitat, das jedoch gegenüber dem mit reinem Inter- α -antitrypsin verschoben ist. (25, 26, 27)

Bei dem Konzentrationsverfahren in der Druckdialysekammer verschwindet die inhibierende Wirkung. Durch diese Manipulation werden die im Sekret vorhandenen Leukozyten zerstört und die Proteasen freigesetzt. Die Inhibitoren gehen mit diesen Proteasen sofort Komplexverbindungen ein und sind somit dem Nachweis entzogen. Wird das Konzentrat mit 5 %iger Perchlorsäure versetzt, werden die Proteine, also auch die Proteasen und das α_1 -Antitrypsin, denaturiert und die säurestabilen niedermolekularen Inhibitoren wieder freigesetzt. Nach der Deproteinisierung findet man oft eine höhere antiproteolytische Aktivität als im nativen Sekret. Dies bedeutet, daß im nativen Sekret bereits ein beträchtlicher Anteil der niedermolekularen säurestabilen Inhibitoren maskiert vorliegt. (20, 21)

Die physiologische Aufgabe freie Protease zu hemmen, zeigt sich beim Vergleich der Verlaufskurve der vorhandenen Inhibitormenge mit dem Verlauf der subjektiven Beschwerden bei pathologischen akuten Vorgängen mit erhöhtem Anfall an Leukozyten und damit an Proteasen. (Abb. 1) Zur Beobachtung einer

Tabelle 1 (29, 28): Aminosäurezusammensetzung der säurestabilen Proteaseninhibitoren aus Bronchialsekret aus der 24-, 48-, 72-h-Hydrolyse

	Inhibitor (Mgw. 14 000) (%)	Inhibitor (Mgw. 20 000) (%)
Asparaginsäure	12,8	13,9
Threonin	7,2	6,3
Serin	12,0	4,1
Glutaminsäure	9,6	8,4
Prolin	9,6	9,4
Glycin	4,8	4,8
Alanin	4,0	3,8
Cystin/2	9,6	8,1
Valin	1,6	3,4
Methionin	1,6	5,8
Isoleucin	4,8	3,8
Leucin	4,8	6,2
Tyrosin	2,4	5,3
Phenylalanin	2,4	3,9
Lysin	6,4	6,3
Histidin	3,2	2,1
Arginin	3,2	4,2
N-terminale Aminosäure	Asp. Ser. 2:1	Alanin
N-Acetylglucosamin		8,2

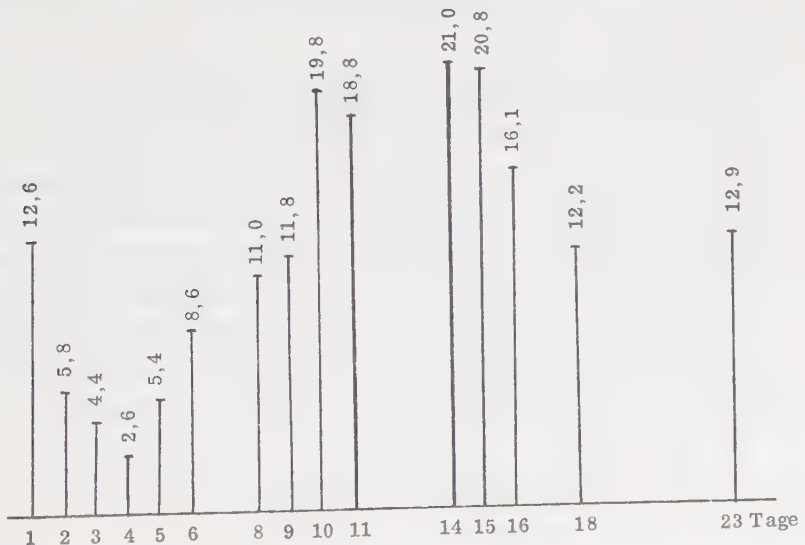
Abb. 1 (29: Patient: 40 Jahre, männlich

Anamnese: Neigung zu NNH-Infekten, früher bereits mehrfach eitrige Sinusitis, zuletzt vor 6 Monaten. Nase leicht geschwollen, seit nachts beginnender Katarrh, "es heißt, als ob ein Katarrh sich entwickle."

Befund: Nasenschleimhaut etwas gerötet, wenig Sekret.

Diagnose: Beginnende Rhinitis.

1. Tag Verlauf: Sekretabnahme.
2. Tag Zunahme der Beschwerden.
4. Tag Subjektiv Höhepunkt erreicht, Rö-NNH: Beide Kieferhöhlen Randschleier.
11. Tag Subjektiv nur wenig gebessert.
14. Tag Praktisch beschwerdefrei.
18. und 23. Tag Kontrolle im beschwerdefreien Zustand.



akuten Erkrankung über einen längeren Zeitraum wurden wegen der einfacheren Sekretgewinnung Nasensekrete verwendet. Mit der Zunahme der subjektiven Beschwerden bei Rhinopathien und Sinusitiden sinkt die Inhibitoraktivität schnell bis auf ein Minimum - bis Null möglich - ab. Zu diesem Zeitpunkt ist auch der Höhepunkt der subjektiven Beschwerden erreicht. In der Heilungsphase, während der der Patient zunächst nur eine geringe Besserung verspürt, steigt die Inhibitormenge bis über den Normalwert an und fällt erst, wenn die Symptome verschwunden sind, wieder allmählich auf den individuellen Normalwert ab. (29) Bei diesen Untersuchungen wurde das Nasensekret jeweils mit 5 % Perchlorsäure behandelt, das bedeutet, daß immer die freie und maskierte Menge der niedermolekularen säurestabilen Inhibitoren zusammen gemessen wurden. Der anfängliche starke Abfall des Inhibitorspiegels ist demzufolge auf eine verminderte Sekretion zurückzuführen und nicht auf einen erhöhten Anteil an maskiertem Inhibitor. Bei dieser verringerten Sekretion an niedermolekularen Inhibitoren während der ersten Tage eines akuten Geschehens wird ein großer Teil der notwendigen antiproteolytischen Aktivität von dem aus dem Serum übertretenden α_1 -Antitrypsin gestellt. Der relative Wert für das α_1 -Antitrypsin kann dabei erheblich ansteigen. (20)

4.2. Die Proteaseninhibitoren im Blutserum

Im menschlichen Blutserum lassen sich folgende Proteaseninhibitoren unterscheiden: Antichymotrypsin, α_2 -Makroglobulin, C 1 Inaktivator, Antithrombin III, Inhibitoren im Bereich des Blutgerinnungssystems und der Fibrinolyse und das oben beschriebene α_1 -Antitrypsin. Außerdem sind noch das Inter- α -antitrypsin und zwei niedermolekulare säurestabile Proteaseninhibitoren im Serum vorhanden. (2)

4.2.1. Das Inter- α -antitrypsin

Bei der Elektrophorese des Serums liegt das Inter- α -antitrypsin zwischen der α_1 - und α_2 -Globulinfraction. Der Inhibitor hat ein Molekulargewicht von 140 000. Der sehr hochmolekulare Stoff ist so instabil, daß er spontan in mehrere Bruchstücke zerfällt, die jedoch noch mit dem spezifischen Antiserum reagieren. Allerdings sind die Präzipitate gegen dasjenige der Reinsubstanz verschoben. Das Inter- α -antitrypsin ist ein Arginininhibitor und hemmt die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin, jedoch keine leukozytären Proteasen. Die physiologische Bedeutung dieses Hemmstoffes konnte bis jetzt noch nicht definiert werden. (27)

4.2.2. Die niedermolekularen Serum-inhibitoren

Die beiden niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren lassen sich sowohl im Serum wie auch im Harn und der Plazenta nachweisen. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und der Molekulargewichte von 22 000 und 44 000 muß angenommen werden, daß es sich bei dem höhermolekularen um ein Dimeres des niedermolekularen Inhibitors handelt. (Tab. 2) Diese Annahme wird noch durch die Tatsache erhärtet, daß ein Protein mit dem Molekulargewicht von 44 000 die Prozedur der Enteiweißung mit 5 % Perchlorsäure nicht übersteht. Die beiden Inhibitoren sind wie das Inter- α -antitrypsin Arginininhibitoren und weisen auch das gleiche Hemmspektrum auf. Bei der Immunelektrophorese mit normalem Standard-anti-humaner Serum bilden sich keine Niederschläge aus. Wird jedoch Anti-inter- α -trypsininhibitorserum, das im Standard-anti-humaner Serum nicht enthalten ist, verwendet, sind eindeutige Präzipitate zu erkennen. Die Lokalisation der Niederschläge ist allerdings gegenüber denen mit reinem Inter- α -antitrypsin verschoben. Ebenso ließ sich keine Übereinstimmung der Präzipitate mit denen der Inter- α -antitrypsinbruchstücke feststellen. Dies

Tabelle 2 (30): Aminosäurezusammensetzung der säurestabilen Proteaseinhibitoren aus Humanplasma, berechnet aus der 24-, 48-, 72-h-Hydrolyse

	Inhibitor (Mol.-Gew. 44 000)		Inhibitor (Mol.-Gew. 22 000)	
	aus Eiweiß- stoffs-Überstand (%)	aus Nativ- Plasma (%)	aus Eiweiß- stoffs-Überstand (%)	aus Nativ- plasma (%)
Asparaginsäure	10,1	9,0	10,0	9,9
Threonin	4,8	4,6	4,7	4,5
Serin	3,2	3,7	3,5	5,2
Glutaminsäure	12,3	11,0	14,7	12,7
Prolin	6,8	7,5	6,8	9,0
Glycin	6,8	7,3	4,5	6,3
Alanin	4,0	5,4	4,4	4,2
Cystin/2	11,8	11,4	13,8	10,3
Valin	5,8	5,3	4,5	3,4
Methionin	1,3	0,4	1,3	0,5
Isoleucin	2,0	2,2	1,7	2,4
Leucin	6,6	6,2	9,5	7,2
Tyrosin	5,6	4,6	3,8	4,7
Phenylalanin	6,3	6,2	5,1	5,8
Lysin	6,8	5,5	5,8	6,0
Histidin	-	-	-	-
Arginin	4,0	5,1	3,9	4,2
Glucosamin	1,8	4,6	2,0	3,7
N-terminale Aminosäure +)	1,24 ++	1,24 ++	1,24 ++	1,24 ++

bedeutet, daß die niedermolekularen Inhibitoren zwar die gleichen Antigendeterminanten besitzen, aber eine andere Beweglichkeit haben. Eine physiologische Bedeutung konnte diesen Inhibitoren noch nicht zugeschrieben werden. (30, 31, 32, 33, 34)

5. Die Beziehungen der Inhibitoren zueinander

Die niedermolekularen Proteaseninhibitoren des oberen Respirationstraktes und des Serums, sowie das Inter- α -antitrypsin zeigen verschiedene identische bzw. ähnliche Eigenschaften: Bei der Immunelektrophorese mit dem polyvalenten Anti-humanserum, das jedoch keinen Anti-inter- α -trypsininhibitor enthält, bildet keiner der genannten Hemmstoffe ein Präzipitat. Bei Verwendung von Anti-inter- α -trypsininhibitoren erhält man jeweils deutliche Präzipitate. Aufgrund der unterschiedlichen Beweglichkeit der einzelnen Moleküle sind die Niederschläge an verschiedenen Stellen lokalisiert. Beim Vergleich der Präzipitate der niedermolekularen Sekret- und Serum-inhibitoren mit den Niederschlägen der Bruchstücke des sehr labilen Inter- α -antitrypsins konnte keine Identität festgestellt werden. Diese Tatsache beweist, daß die niedermolekularen Hemmstoffe nicht durch spontanen Zerfall des Inter- α -antitrypsins entstehen. (30) Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die niedermolekularen Inhibitoren durch aktive Spaltungsvorgänge gebildet werden. (26) Die niedermolekularen Sekret- und Serum-inhibitoren, sowie das Inter- α -antitrypsin sind Arginininhibitoren. Die Hemmspektren zeigen ebenfalls eine auffallende Ähn-

+) Die N-terminale Aminosäure konnte nicht identifiziert werden.

++) Relative R_F -Werte in Chloroform/Benzylalkohol/Essigsäure 7 : 3 : 0,3
auf Dünnschichtplatten (R_F -Wert von Bis (dinitrophenyl) lysin = 1)

lichkeit. Allerdings vermögen die niedermolekularen Inhibitoren der Sekrete der oberen Luftwege noch zusätzlich leukozytäre und bakterielle Proteasen zu hemmen. (25; Tab. 3)

Diese Beobachtungen deuten die Möglichkeit einer direkten Beziehung der niedermolekularen Inhibitoren der Sekrete des oberen Respirationstraktes zu den niedermolekularen Serum-inhibitoren bzw. zum Inter- α -antitrypsin an. Da die Sekretinhibitoren im Serum nicht vorhanden sind, müssen sie entweder direkt in der Schleimhaut produziert werden oder die niedermolekularen Serum-inhibitoren bzw. das Inter- α -antitrypsin werden beim Durchgang durch die Schleimhaut modifiziert, wobei die Antigendeterminanten offenbar erhalten bleiben. Dieser Umbau würde dann auch ein spezifisches Hemmzentrum gegen Leukozytenproteasen freilegen. Die Becherzellen bzw. die in der Submucosa liegenden gemischten Drüsen könnten als Bildungsorte angesehen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Serum-inhibitoren nur eine Transportform der rückresorbierten niedermolekularen Sekretinhibitoren sind. (30, 35) In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren beiderseits der Blut-Sekret-Schranke ein näherer Einblick in diese Problematik erbracht werden.

Eine Erhöhung der Konzentration des niedermolekularen Sekretinhibitors bei den diversen Erkrankungsarten müßte zu einer Konzentrationsverringerung des Inter- α -antitrypsins oder der niedermolekularen, säurestabilen Serum-inhibitoren im Blutserum führen, sofern der Sekretinhibitor aus einem der beiden genannten Hemmstoffe gebildet wird. Falls jedoch einer der Inhibitoren aus dem Serum eine Transportform des rückresorbierten Sekretinhibitors ist, würde sich dies bei einer Erniedrigung der Konzentration im Sekret durch einen höheren Inhibitorspiegel im Serum manifestieren.

Tabelle 3: Eigenschaften der mit dem Inter- α -antitrypsin korrelierenden Inhibitoren

	Mgw.	Hemm- zentrum	Kreuz- reaktion	Trypsin	Hemmung:			Leukozyt. Proteasen
					Chymo- trypsin	Plasmin		
Inter- α -antitrypsin	140 000	Arginin	+	+	+	+		-
Bronchialsekretinhibitor I	14 000	"	+	+	+	+		++ +
" II	20 000	"	+	+	+	+		++ +
Seruminhibitor I	44 000	"	+	+	+	+		-
" II	22 000	"	+	+	+	+		-
Harninhibitor I	44 000	"	+	+	+	+		-
" II	22 000	"	+	+	+	+		-
Plazentainhibitor I	44 000	"	+	+	+	+		-
" II	22 000	"	+	+	+	+		-

III. ERGEBNISSE

Als Sekret des oberen Respirationstraktes wurde, um vergleichbare Werte zu bekommen, nur Bronchialsekret untersucht. In allen Fällen handelte es sich um chronische Erkrankungen des broncho-pulmonalen Bereichs. Den größten Anteil stellen Patienten mit tuberkulösen Veränderungen, die zweite Gruppe sind Fälle mit malignen und benignen Tumoren, und bei der dritten Gruppe liegen chronische, entzündliche Prozesse wie chronische Bronchitis und chronische Pneumonie vor. Die antiproteolytische Aktivität im Bronchialsekret wurde immer nach der Deproteinisierung bestimmt. Die Werte geben somit die gesamte Menge der freien und maskierten niedermolekularen säurestabilen Inhibitoren an. Bei der Gewinnung des Bronchialsekrets wurde der Absaugschlauch jeweils mit verschiedenen Mengen Pufferlösung durchgespült. Um die hieraus resultierenden unterschiedlichen Verdünnungen auszuschalten, wurde die Inhibitormenge im Fluat auf die vorhandene Proteinmenge bezogen. Als Einheit für die Inhibitorkonzentration im Bronchialsekret ergibt sich somit $\frac{\text{Im U}}{\text{mg Protein}}$. Allerdings konnten die Mengen in den Fällen, bei denen die Proteinkonzentration unter etwa $0,05 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ sank, nicht mehr mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

Die Inhibitorkonzentration im Bronchialsekret bei den Patienten mit Tuberkulose zeigt eine große Schwankungsbreite. Der Mittelwert liegt bei $22,9 \frac{\text{Im U}}{\text{mg}}$. Eine signifikante Konzentrationsveränderung, die durch die Tuberkulose bedingt sein könnte, läßt sich nicht erkennen. Die Konzentrationen des Inter- α -antitrypsins aus dem Serum - Mittelwert $68 \text{ mg\%}$ - und der niedermolekularen, säurestabilen Serum-inhibitoren - Mittelwert $5,3 \frac{\text{Im U}}{\text{ml}}$ - lassen keine Beziehung zu der Erkrankung feststellen. Die unterschiedlich hohen Inhibitorkonzentrationen im Bronchialsekret zeigen keinen erkennbaren Zusammenhang zu den Konzentrationen des

Inter- α -antitrypsins aus dem Serum, oder den niedermolekularen säurestabilen Seruminhibitoren.

In der Gruppe mit Tumoren im broncho-pulmonalen Bereich unterscheiden sich die Inhibitorkonzentrationen nur geringfügig von denen aus der Gruppe mit den Tuberkulosepatienten. Die Tumoren lassen keinen Einfluß auf die Inhibitoren sowohl im Bronchialsekret als auch im Serum erkennen. Ebenso kann man keinen Zusammenhang der niedermolekularen Sekretinhibitoren zum Inter- α -antitrypsin aus dem Serum oder zu den niedermolekularen Seruminhibitoren feststellen.

In allen Fällen mit chronischer Bronchitis und chronischer Pneumonie ist die antiproteolytische Aktivität im Bronchialsekret, die auf die niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren zurückzuführen ist, erheblich unter dem Durchschnittswert der anderen Patienten. Der Mittelwert liegt für diese Gruppe bei $7,8 \frac{\text{ImU}}{\text{mg}}$. Die starke Verringerung der Inhibitorkonzentration dürfte hier auf die Schädigung der Schleimhaut durch die entzündlichen Prozesse zurückzuführen sein. Diese signifikante Konzentrationsänderung bleibt jedoch nur auf die niedermolekularen, säurestabilen Sekretinhibitoren beschränkt. Die Konzentrationen für das Inter- α -antitrypsin und die niedermolekularen Inhibitoren aus dem Serum liegen im selben Bereich wie in den anderen Fällen.

Aus den vorliegenden Befunden läßt sich kein Zusammenhang zwischen den niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren aus dem Bronchialsekret und dem niedermolekularen Hemmstoff oder dem Inter- α -antitrypsin aus dem Serum erkennen. Eine Beziehung der genannten Seruminhibitoren zum inhibierenden System des oberen Respirationstraktes scheint nicht zu bestehen. Somit müssen die niedermolekularen, säurestabilen Bronchialsekretinhibitoren ein selbständiges Produkt des Flimmerepithels sein.

Tabelle 4

Legende:

- I: Inter- α -antitrypsin-Konzentration im Serum in mg%.
- II: Konzentration der niedermolekularen Seruminhhibitoren in $\frac{\text{ImU}}{\text{ml}}$.
- III: Konzentration der niedermolekularen Brochialsekretinhibitoren in $\frac{\text{ImU}}{\text{mg Protein}}$.
- IV: Gesamtproteinkonzentration im Sekreteluat in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

1. Patienten mit Tuberkulose

	I	II	III	IV
1	102	2,3	4,1	0,477
2	65	2,8	29,7	0,047
3	110	4,9	25,4	0,053
4	47	6,8	19,8	0,092
5	50	3,6	53,2	0,05
6	101	8,6	2,9	0,78
7	52	4,1	14,4	0,22
8	42	5,5	22,7	0,12
9	46	6,4	32,4	0,042
10	58	6,4	12,5	0,073
11	99	4,0	60,0	0,053
12	72	3,6	11,1	0,063
13	80	8,3	28,3	0,077
14	59	9,5	33,7	0,054
15	59	5,5	1,1	3,8
16	75	2,7	21,2	0,105
17	63	2,8	4,4	0,21
18	60	4,8	40,8	0,05
19	52	6,8	5,8	0,12

	I	II	III	IV
20	47	2,7	19,4	0,07
21	65	3,5	37,0	0,06
22	69	0,9	13,0	0,07
23	63	3,6	37,0	0,06
24	92	2,8	11,4	0,29
46	92	3,6	19,6	0,067

Patienten mit Tuberkulose und Diabetes mellitus

40	47	6,8	19,8	0,092
41	80	8,3	28,3	0,077
42	59	9,6	33,7	0,054
zusätzlich:	toxischer Leberschaden und kompensierte Herzinsuffizienz			
Mittelwert	68	5,3	22,9	

2. Patienten mit Tumoren im broncho-pulmonalen Bereich

30	96	2,8	0,6	1,55
31	69	8,7	12,2	0,29
32	81	13,3	6,3	0,5
33	47	6,4	15,2	0,12
34	63	10,9	13,7	0,57
35	25	10,2	0,5	0,875
36	69	3,5	44,3	0,06
37	93	4,4	41,0	0,043
38	70	9,1	36,4	0,05
39	52	4,5	17,0	0,16
Mittelwert:	67	7,4	18,7	

3. Patienten mit broncho-pulmonalen Entzündungen

	I	II	III	IV
25	74	7,7	9,7	0,14
26	48	1,8	6,1	0,3
27	63	2,8	4,4	0,21
28	58	6,0	8,3	0,057
29	37	3,2	10,5	0,13
Mittelwert:	56	4,3	7,8	

4. Sonstige Fälle

43	86	2,2	56	0,06
ohne Lungenbefund, Verdacht auf diabetische Stoffwechselstörung				
44	47	5,6	13,3	1,05
Alte Einlagerungen in rechter Lungenspitze, Diabetes mellitus, Cholelithiasis				
45	72	2,7	19,9	0,16
Fünfmarkstückgroßer Rundherd parahilär, li. Mittelfeld				
47	77	2,4	8,2	0,94
Hiluslymphknotenvergrößerung				

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Bei der Bronchoskopie wurde den Patienten mit einem kleinen Schlauch Bronchialsekret entnommen. Im allgemeinen wurden dabei nur sehr geringe Mengen des mucösen Sekrets gewonnen. Die Schläuche wurden deshalb mit Pufferlösung durchgespült, um eine für die Untersuchungen ausreichende Menge Eluat zu erhalten. Für die Bestimmung des Inter- α -trypsininhibitors und der niedermolekularen Serum-inhibitoren entnahm man den Patienten noch einige Milliliter Blut.

2. Vorbereitung des Bronchialsekreteluats und des Serums zur Bestimmung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren

Zur Messung der Konzentrationen der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren im Bronchialsekret und im Serum müssen die anderen Inhibitoren wie das α_1 -Antitrypsin eliminiert werden. Da die niedermolekularen Inhibitoren säurestabil sind, kann man mit Perchlorsäure alle anderen Proteine denaturieren, wobei gleichzeitig die maskiert vorliegenden niedermolekularen Inhibitoren freigesetzt werden.

Material:

70 %ige Perchlorsäure,

20 %ige NaOH

Durchführung:

Auf je 1 ml Bronchialsekret bzw. 0,5 ml Serum werden 20 μ l Perchlorsäure gegeben und gut durchgeschüttelt. Nach ca. 10 Minuten zentrifugiert man das ausgefallene Eiweiß bei 5 000 Umdrehungen/Minute ab. Der klare Überstand wird dann mit NaOH neutralisiert, da die Inhibitorbestimmungen bei pH 7,8 durchgeführt werden.

3. Bestimmung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren aus dem Bronchialsekret und dem Serum

Das proteolytische Pankreasenzym Trypsin setzt aus dem Substrat N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid den Farbstoff p-Nitroanilid frei. Im Photometer läßt sich die Spaltungsreaktion direkt als Extinktionszunahme bei 405 nm verfolgen. Da die Trypsinkonzentration für die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmend ist, gilt das Lambert-Beersche Gesetz hier wie folgt: $\Delta E = \epsilon \cdot c$, wobei ΔE die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist. Befindet sich in der Lösung noch zusätzlich ein Trypsininhibitor, so wird ein Teil des Trypsins daran gebunden. Die durch das noch freie Trypsin bewirkte Spaltung verläuft dann entsprechend langsamer. Aus dieser Geschwindigkeitsdifferenz berechnet sich die Inhibitoraktivität.

Material:

Trypsin, TPCK behandelt; Merck:

5 mg in 100 ml 0,0025 n HCl gelöst (50 μ l/ml = 50 mU/ml);

TRA-puffer (= Triäthanolaminpuffer); 0,2 m; pH 7,8, 0,1 m CaCl₂: 16,8 g Tra und 7,35 g CaCl₂ · 2 H₂O in 450 ml Wasser lösen, mit 2 n NaOH auf pH 7,8 einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Die Trypsinaktivität liegt in Ca²⁺-haltigem Puffer um 4 % höher als in nicht Ca²⁺-haltigem Puffer.

BAPA: 100 mg in 100 ml Wasser bei 95° lösen.

Durchführung:

Für die Hemmwertbestimmung ist zunächst der Vergleichswert notwendig:
In eine Glasküvette werden 0,2 ml Trypsinlösung ($\approx 10\%$) mit TRA-puffer auf 2 ml aufgefüllt. Die Spaltungsreaktion wird durch Zugabe von 1 ml BAPA gestartet. Die gemessene Extinktionsänderung ΔE_{405} pro Zeiteinheit (72 Sekunden) bildet den Vergleichswert.

1% Trypsin bewirkt dabei $0,1 \cdot \Delta E_{\text{Vergleichswert}}$ in 3 ml Lösung.

Zur Hemmwertbestimmung werden in eine Küvette zu 0,2 ml Trypsinlösung 0,5 ml der inhibitorhaltigen Lösungen gegeben, mit TRA-puffer auf 2 ml aufgefüllt und gut gemischt. Die Inhibitormengen müssen dabei so gewählt werden, daß die Hemmung möglichst etwas unter 50 % beträgt, da die Hemmkurve bei über 50 % Hemmung nicht mehr linear verläuft. Die am Küvettenhalter angeschlossene Kühlung ist auf eine Temperatur von 25°C eingestellt, um für alle Messungen gleiche Bedingungen zu erhalten. Die Reaktion wird nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Minuten durch Zugabe von 1 ml BAPA gestartet. Man liest die Extinktion 5mal alle 72 Sekunden ab, berechnet die jeweiligen ΔE_{404} pro 72 Sekunden und bildet aus den 4 Werten das arithmetische Mittel.

Aus der Extinktionsverminderung von Vergleichswert und Hemmwert läßt sich der Inhibitorgehalt der Lösung berechnen:

$$\Delta E_{\text{Vergleichswert}} - \Delta E_{\text{Hemmwert}} = \Delta E_{\text{Verminderung}}$$

Laut Definition hebt 1 ImU die hydrolytische Wirkung von 1% Trypsin gegen BAPA auf. Wird die Extinktionsänderung um $0,1 \cdot \Delta E_{\text{Vergleichswert}}$ verringert, entspricht das 1 ImU in der eingesetzten Lösung:

$$\frac{\Delta E_{\text{Verminderung}}}{0,1 \cdot \Delta E_{\text{Vergleichswert}} \cdot 0,5 \text{ ml (eingesetzt)}} = \frac{\text{Zahl der ImU}}{\text{ml Testlösung}}$$

Um beim Bronchialsekret die unterschiedlichen Verdünnungen auszuschalten, wurde die antiproteolytische Aktivität auf die vorhandene Proteinmenge bezogen:

$$\frac{\text{Zahl der ImU}}{\text{ml Eluat}} : \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Eluat}} = \frac{\text{Zahl der ImU}}{\text{mg Protein}}$$

4. Bestimmung des Proteingehalts im Bronchialsekreteluat

Prinzip:

Für eine genaue Bestimmung des Proteingehalts mittels der Ninhydrinreaktion werden die Eiweißmoleküle durch alkalische Hydrolyse in ihre Aminosäurebausteine zerlegt. Zwei Moleküle Ninhydrin gehen mit der α -Aminogruppe der Aminosäure eine Verbindung ein, die eine Blaufärbung aufweist. Die Extinktion, gemessen bei 578 nm, verläuft über einen weiten Bereich linear zur Konzentration der Aminosäuren und damit auch zur Proteinkonzentration. Um die Extinktionswerte in Eiweißkonzentrationen umrechnen zu können, wird eine Eichkurve aus Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration aufgestellt.

Material:

Ninhydrinlösung: 2 % in Äthylenglycol - Na-acetat-puffer

3 : 1, 0,4 m. pH 5,5

2,5 n NaOH

30 %ige CH_3COOH

Propanol - Wasser 1 : 1

Eichlösungen mit 2, 1 und 0,5 mg Albumin/ml

Messung im Eppendorf-Photometer bei 578 nm, d = 1 cm gegen Wasser

Durchführung:

Von den Eichlösungen bzw. dem Bronchialsekreteluat werden jeweils 0,1 ml mit 1 ml NaOH (2,5 n) versetzt. Zur Hydrolyse der Proteine wird der Ansatz 45 Minuten im Wasserbad erhitzt. Die alkalische Lösung wird dann mit 1 ml CH_3COOH (30 %ig) neutralisiert und 2 ml Ninhydrinlösung zugegeben. Die Ninhydrinreaktion verläuft bei 20-minütigem Erhitzen im Wasserbad quantitativ. Die Reaktionslösung wird mit 10 ml Propanol-Wasser verdünnt.

Aus den Extinktionen der Eichlösungen wird eine Eichkurve aufgestellt, aus der sich die Proteinkonzentrationen der Bronchialsekreteluats bei bekannter Extinktion direkt ablesen lassen. Da die Ninhydrinreaktion sehr empfindlich ist, ist es notwendig, alle Werte dreifach zu bestimmen.

5. Quantitative Bestimmung des Inter- α -antitrypsins im Serum

Prinzip:

Der spezifische Nachweis des Inter- α -antitrypsins erfolgt mit der Elektrophorese nach Laurell. In der Elektrophorese wandern die Serumproteine bei einem pH-Wert von 8,6 alle zur Anode. Ist im Elektrophoreseträger das spezifische Antiserum Anti-inter- α -trypsininhibitor enthalten, reagiert das zur Anode wandernde Inter- α -antitrypsin so lange mit den spezifischen Antikörpern, bis die gesamte, im aufgetragenen Serum vorhandene Menge Antigen aufgebraucht ist. An der Grenze bildet sich eine Präzipitatslinie aus dem Antigen-Antikörper-Komplex in Form einer Gauss-Kurve. Die Scheithöhe dieser Präzipitatslinie steht in fast linearer Beziehung zur eingesetzten Menge Antigen. Für die Umrechnungen der Gipfelhöhe in die Konzentrationen muß zuerst eine Eichkurve aus einem Probeserum mit bekannter Konzentration an Inter- α -antitrypsin erstellt werden.

Material:

Objektträger mit Agarosegelschicht: 50 · 100 mm

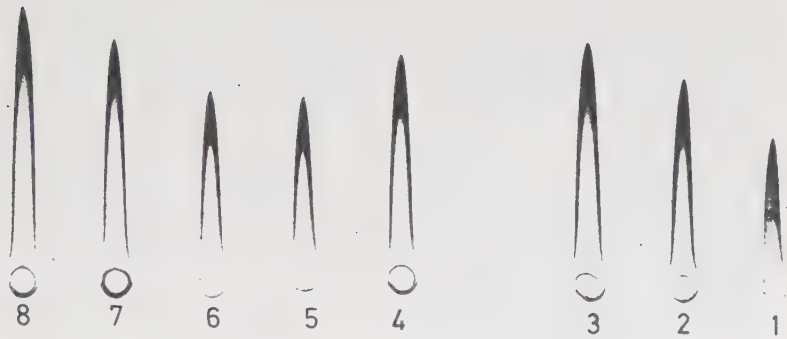
Barbituratpuffer: pH 8,6, 0,05 mM

Anti-inter- α -trypsininhibitor vom Kaninchen

Durchführung:

Auf den Objektträger, eine Glasplatte mit der Größe 50 · 100 mm, werden 8 ml erhitzte Agarose aufgetragen. Die Agarose wird vorher mit 0,2 ml Anti-inter- α -trypsininhibitorserum vermischt, wobei darauf zu achten ist, daß die Lösung nicht über 56⁰ C heiß ist, da das Antiserum bei einer höheren Temperatur denaturiert wird. In die erstarrte Agarosegelschicht stanzt man auf einer Seite 8 bis 9 Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm im Abstand von etwa 1 cm, um die Seren auf einen möglichst kleinen Ausgangspunkt auftragen zu können. Zur Erstellung der Eichkurve werden auf jede Platte 1, 2 und 3 μ l eines Serums mit bekannter Inter- α -trypsininhibitorkonzentration aufgebracht. In die restlichen Startlöcher pipettiert man je 2 μ l der zu untersuchenden Seren. An die Elektrophoresekammer legt man eine Spannung, der eine Feldstärke von 2 bis 4 Volt/cm auf der Agarosegelplatte entspricht. Nach einer Laufzeit von 6 bis 8 Stunden sind die Präzipitate voll ausgebildet. Aus der Höhe der drei Gipfel mit bekannter Menge an Inter- α -antitrypsin erstellt man sich die Eichkurve, aus der dann die Konzentrationen der untersuchten Seren direkt abgelesen werden können.

Abb. 2: Elektroimmundiffusion nach Laurell für die Inter- α -trypsininhibitorbestimmung



1: 1 μ l Eichserum

2: 2 μ l Eichserum

3: 3 μ l Eichserum

4 - 8: Jeweils 2 μ l der zu untersuchenden Seren

Die nach etwa 6 bis 8 Stunden voll ausgebildeten Präzipitate wurden mit Comassie angefärbt.

V. DISKUSSION

Die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren der oberen Luftwege werden offenbar in der Schleimhaut direkt produziert, da wie die Ergebnisse zeigen, die niedermolekularen Inhibitoren des Serums bzw. das Inter- α -antitrypsin nicht als Vorstufe in Frage kommen. Als Produktionsstätte für die niedermolekularen Inhibitoren des oberen Respirationstraktes sind die in das Flimmerepithel eingelagerten Becherzellen oder die gemischten Drüsen in der Submucosa der Schleimhaut deutbar. Die Drüsen und die Becherzellen liegen im gesamten mit Flimmerepithel ausgekleideten Gebiet, das von der Nase bis zu den Bronchioli terminales reicht. In diesem Bereich wird die antiproteolytische Aktivität zum überwiegenden Teil von den niedermolekularen Sekretinhibitoren gestellt, während weiter distal, in den Bronchioli respiratorii und in den Lungenalveolen der Schutz vor den freien Proteasen ausschließlich vom α_1 -antitrypsin übernommen wird. (20)

Die starke Erniedrigung der gesamten - freier und maskierter - Menge der niedermolekularen, säurestabilen Inhibitoren im Bronchialsekret bei chronischen Entzündungen im broncho-pulmonalen Bereich ist demzufolge auf eine eingeschränkte Produktionskapazität der Schleimhaut zurückzuführen. (29) Der geringe Inhibitorspiegel reicht bei entzündlichen Prozessen oft nicht mehr aus, alle freigesetzten leukozytären Proteasen zu hemmen, die dann ihrerseits das Gewebe angreifen und weiter schädigen. Bei chronischen Verlaufsformen über mehrere Jahre führt diese Autolyse zu Bronchiektasen und Lungenemphysemen.

Um bei pathologischen Vorgängen mit einer erhöhten Anzahl an freien Proteasen bzw. einer verringerten Inhibitorproduktion die Autolyse zu verhindern, zeichnet sich die Möglichkeit ab, die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren direkt in die oberen Luftwege zu applizieren. Ebenso ließe sich

durch Stimulation der Inhibitorproduktion eine Erhöhung der antiproteolytischen Aktivität erreichen, sofern die Schleimhaut noch nicht zu stark geschädigt ist. Möglichkeiten durch Konzentrationsänderungen des Inter- α -antitrypsins bzw. der niedermolekularen Seruminhhibitoren im Blut auf den Inhibitorspiegel des Respirationstraktes oder direkt auf Erkrankungen in diesem Bereich Einfluß zu nehmen, scheinen nicht zu bestehen. Die niedermolekularen Seruminhhibitoren und das Inter- α -antitrypsin zeigen aufgrund der vorgelegten Befunde keine Beziehung zum inhibierenden System der Luftwege und zu den broncho-pulmonalen Erkrankungen. Es ist jedoch nicht völlig auszuschalten, ob mit wesentlich verfeinerten analytischen Methoden doch eine Beziehung feststellbar ist.

Zur genaueren Klärung dieses Sachverhaltes müßte nach Fällen gesucht werden, bei denen überhaupt kein niedermolekularer, säurestabiler Sekretinhibitor vorhanden ist. Die Konzentrationsverschiebungen auf Seiten der Seruminhhibitoren ließen dann weitere Schlüsse zu. Durch den Vergleich der absoluten Mengen bzw. der gesamten pro Tag produzierten und ausgeschiedenen Mengen der Seruminhhibitoren mit denjenigen aus dem Bronchialsekret könnte festgestellt werden, welchen Einfluß die Konzentrationsänderung eines Inhibitors auf die Konzentration eines anderen haben kann, sofern eine Beziehung zueinander besteht.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Sekret des oberen Respirationstraktes übernehmen zum überwiegenden Teil zwei niedermolekulare, säurestabile Proteaseninhibitoren den Schutz vor freien leukozytären Proteasen. Diese Inhibitoren zeigen ähnliche Eigenschaften wie die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren aus dem Serum und Harn, und wie das Inter- α -antitrypsin: Es sind jeweils Arginininhibitoren mit fast identischen Hemmspektren. Bei der Immunelektrophorese bilden sie nur mit dem spezifischen Antiserum gegen das Inter- α -antitrypsin ein Präzipitat. Durch den Vergleich der Konzentrationen konnte gezeigt werden, daß die genannten Serum-inhibitoren in keinem Zusammenhang zum inhibierenden System des oberen Respirationstraktes oder zu Erkrankungen in diesem Bereich stehen. Die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren der Luftwege müssen somit als eigenes Produkt der Schleimhaut dieses Gebietes angesehen werden.

Literaturverzeichnis

1. Karlson P.: Proteolytische Enzyme. Kurzes Lehrbuch der Biochemie (1967) 128 ff.
2. Schuster R.: Dissertation 1974, Ludwig Maximilians-Universität München
3. Schettler G.: Innere Medizin Bd. II, 17 - 25
4. Laurell C.B.: Is emphysema in α_1 -antitrypsin deficiency as result of autodigestion? Scand. J. Clin. Lab. Inv. 28, 1 - 4 (1971)
5. Reichert R., Hochstrasser, K., Hochgesand K.: Proteolyse und obstruktives Lungenemphysem. Münch. med. Wschr. 116 (1974) Nr. 4, 173 - 176
6. Frimmer M.: Biochemie und Pathophysiologie von Entzündungsmediatoren. Intern. Z. klin. Pharm., Ther. Toxikol. 2 (1971) 144 - 151
7. Ambrus, J. L., C.M.: Regulation of elimination of leucocytes. Brookhaven Symp. in Biol. 10 (1957) 84
8. Biermann H. R., Kelly K.H., Cordes, F.L.: Sequestration and visceral circulation of leucocytes in man. Ann. N.Y. Acad. Sci. 59 (1955) 850
9. Lieberman I., Gawad M.A.: Inhibitors and activators of leucocytic proteases in purulent sputum. I. Lab. Clin. Med. 77, 713 - 727 (1971)
10. Gross P., Pfitzer E.A., Tolker E., Babyak M.A., Kaschak M.: Experimental Emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats. Arch. Environ. Health 11 (1966) 50 - 53
11. Kilburn K.H., Dowell A.R., Pratt P.C.: Morphological and biochemical assessment of papain-induced emphysema. Arch. Intern. Med. 127 (1971) 884
12. Pushpakom R.J., Hogg J.C., Woolcock A.J., Angus A.E., Macklem P.T., Thurlbeck W.M.: Experimental papain emphysema in dogs. Amer. Rev. resp. Dis. 102 (1970) 778 - 789

13. Kimbel P., Mass B., Ideda T., Weinbaum G.: Emphysema in dogs induced by leucocyte content. Pulmonary emphysema and proteolyses. Ed. Charles Mittman, p. 411 - 417. Academic press. New York - London 1972
14. Golgring I.P., Park S.S., Greenberg L., Ratner I. M.: Sequential Anatomic Changes in Lungs Exposed to Papain and Other Proteolytic Enzymes. Pulmonary Emphysema and Proteolyses (1972) 389 - 409
15. Flindt M.L.H.: Pulmonary disease due to inhalation of derivates of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. Lancet (1969/I) 1177 - 1181
16. Wuthrich B., Schwarzspeck M.: Asthma bronchiale nach beruflicher Exposition mit proteolytischen Enzymen (*Bacillus-subtilis*-Proteasen). Schweiz. med. Wschr. 100 (1970) 1908 - 1914
17. Kueppers F., Fallat R., Larson R.K.: Obstructive lung disease and α_1 -antitrypsin deficiency gene heterozygosity. Science 165 (1969) 899 - 901
18. Liebermann J.: Heterozygous and homozygous α_1 -antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. New. Engl. J. Med. 281 (1969) 279 - 284
19. Welch M.H., Richardson R.H., Whitcomb W.H., Hammersten H.F., Guenter C.A.: The lung scan in α_1 -antitrypsin deficiency. J. nucl. Med. 10 (1969b) 687 - 690
20. Reichert R., Hochstrasser K., Conradi G.: Untersuchungen zur Proteasehemmkapazität des menschlichen Bronchialsekrets. Z. Pneumonologie 147 (1972) 13 - 20
21. Reichert R., Hochstrasser K., Werle E.: Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors in menschlichem Bronchialsekret. Z. Laryng. Rhinol. 51 (1972) 190 - 193
22. Hochstrasser K., Haendle H., Reichert R., Werle E.: Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteaseninhibitors im menschlichen Nasensekret. Z. physiol. Chem. 352 (1971) 954
23. Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.: Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret. Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 221 - 226

24. Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.: Detection and Isolation of a Second Acid Stable Proteinase Inhibitor from Human Bronchial Mucus. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354 (1973) 923 - 926
25. Hochstrasser K., Reichert R., Matzner M., Werle E.: Hemmbarkeit proteolytischer Enzyme in pathologischen Nasensekreten und von Leukocytenproteasen durch den natürlichen Proteaseninhibitor des Nasensekrets. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10 (1972) 104 - 107
26. Hochstrasser K., Reichert R., Heimbürger N.: Antigenic relationship between bronchialmucus inhibitor and the plasma inter- α -trypsininhibitor of man.
27. Heide K., Heimbürger N., Haupt H.: Clin. Chem. Acta 11 (1965) 153
28. Hochstrasser K., Reichert R., Werle E., Haendle H.: New Proteinase Inhibitors of Some Mucous Membranes of the Human Body. Protides of the Biological Fluids - 20th Colloquium. H. Peeters (1973) 417 - 427
29. Reichert R., Hochstrasser K.: Veränderungen des Proteaseninhibitorspiegels im menschlichen Nasensekret im Verlauf verschiedener Rhinopathien. Z. Laryng. Rhinol. 51 (1972) 73 - 80
30. Hochstrasser K., Feuth H., Steiner O.: Zur Charakterisierung der säurestabilen Proteaseninhibitoren aus Humanplasma. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354 (1973) 927 - 932
31. Peansky R.J., Laskowsky M.: J. Biol. Chem. 204 (1953) 153
32. Shulman N.R.: J. Biol. Chem. 213 (1955) 655 - 671
33. Astrup T., Sterndorf J.: Scand. J. Clin. Inv. 7 (1955) 239
34. Orochsch G.J., Nordschow C.D.: Intersoc. (1972) 261
35. Hochstrasser K.: Bronchitis: Neues Therapieprinzip. Ärztl. Praxis 25 (1973) Nr. 36, 1749

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser für die Bereitstellung des Themas und des Laborplatzes, sowie für die umfangreiche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Blaha und seinen Mitarbeitern im Zentralkrankenhaus Gauting möchte ich meinen herzlichsten Dank für die gute Zusammenarbeit aussprechen.

Allen Mitarbeitern von Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser, besonders Herrn Dr. K. Hochgesand und Frau S. Heindl möchte ich für die vielen kleinen und großen Hilfen bei meiner Arbeit danken.

Lebenslauf

Geboren:	3. 11. 1948 in Mittenwald
Vater:	Norbert Tisowsky, Zahnarzt
Mutter:	Margarete, geb. Gottschalk
1954 - 1956	Volksschule in Apfeldorf
1956 - 1958	Volksschule in Rott
1958 - 1960	Volksschule in Algasing
1960 - 1969	Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Schongau
Wintersemester 1969/70	Elektrotechnikstudium an der Techni- schen Universität in München
seit April 1970	Zahnmedizinstudium an der Universität München
März 1971	Vorphysikum
Oktober 1972	Physikum
Juli 1975	Staatsexamen in München

